

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Numero de publication

0 222 722  
A2

(12)

# DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt 86870042.8

(22) Date de dépôt: 08.04.86

(51) Int. Cl.<sup>4</sup> C 07 K 15/00

A 61 K 37/02, A 61 K 39/395,  
A 61 K 47/00, A 61 K 31/475  
// C07D519/04

(30) Priorité 12.11.85 LU 86157

(43) Date de publication de la demande:  
20.05.87 Bulletin 87/21

(54) Etats contractants désignés:  
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(71) Demandeur: OMNICHEM Société anonyme  
12 Avenue de Broqueville  
B-1150 Bruxelles (BE)

(72) Inventeur: Trouet, André Benoît Léon  
29 Predikherenberg  
B-3009 Winksele (BE)

Rao, Kandukuri Sivaprasade Bushana  
11 rue Kwakembienne  
B-1331 Rosières (BE)

Hannart, Jean-Alfred Alphonse  
25 Avenue d'El Pirere  
B-1302 Dion-Valmont (BE)

DeJonghe, Jean-Paul  
94 Rue Ch. Jaumotte  
B-1350 Wavre (BE)

(74) Mandataire: Van Malderen, Michel et al  
p.a. Freylinger & Associés 22 avenue J.S. Bach (bte 43)  
B-1080 Bruxelles (BE)

(54) Nouveaux conjugués de la vinblastine et de ses dérivés, procédé pour leur préparation et compositions pharmaceutiques contenant ces conjugués.

(57) On décrit des nouveaux conjugués de vinblastine ou de dérivés de celle-ci répondant à la formule générale

EMI PA = 00 FR = 1 HE = 95 WI = 100 TI = CHE

dans laquelle A représente un "bras" du type

$$\begin{array}{c} \text{NH-R} \\ | \\ -\text{COCH}-(\text{CH}_2)_n\text{CO}- \end{array}$$
 n variant de 1 à 5 et R représentant un groupe acyle tel que acétyle, trifluoroacétyle ou carbobenzyloxy. R<sub>1</sub> représente un radical protéique éventuellement modifié. R<sub>2</sub> représente un groupe méthoxy, un groupe amino ou un radical ester d'acide alpha-aminé lié par une liaison de type amide et dont le groupe ester comporte de 1 à 6 atomes de carbone. R<sub>3</sub> représente un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyle, chaque fois dans les deux configurations possibles.

EP 0 222 722 A2

40 NOUVEAUX CONJUGES DE LA VINBLASTINE ET DE SES DERIVES. PROCEDE POUR LEUR PREPARATION  
ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES CONTENANT CES CONJUGUES.

La présente invention se rapporte à de nouveaux conjugués de la vinblastine et de certains de ses dérivés connus avec des protéines ou des fragments de protéines servant d'agent anti-tumoral. L'invention s'étend également à un procédé pour les préparer et à des compositions pharmaceutiques contenant ces conjugués.

45 La vinblastine et certains de ses dérivés, en particulier la vincristine ou la vindésine, ont déjà été couplés à des protéines par exemple l'albumine ou diverses immunoglobulines. Il en résulte des produits de couplage ou des composés dits "conjugués". Nous relevons notamment les références suivantes de la littérature :

- 50 - J.D. Teale, Jacqueline M.Clough et V.Marks., Br.J.Clin.Pharmac. 4, 169-172, 1977  
- C.H.J.Ford, C.E.Newman, J.R.Johnson, C.S.Woodhouse, T.A.Reeder, G.F.Rowland, R.G.Simmonds, Br.J.Cancer 47, 35-42, 1983  
- M.J.Embleton, G.F.Rowland, R.G.Simmonds, E.Jacobs, C.H.Marsden, R.W.Baldwin Br.J.Cancer 47,43-49, 1983  
55 - J.R.Johnson, C.H.J.Ford, C.E.Newman, C.S.Woodhouse, G.F.Rowland, R.G.Simmonds Br.J.Cancer, 44, 472-475, 1981  
- Eli Lilly Eur.Pat.Applic., Publ. n°56.322, 21.07.82  
- R.A. Conrad, G.J.Cullinan, K.Gerzon, G.A.Poore J.Med.Chem. 22, 391, 1979

On peut également citer la demande de brevet européen n° 84 870 057.1 dans laquelle on décrit le couplage de dérivés bis-indoliques à une protéine, un fragment de protéine ou une amine par l'intermédiaire d'un bras du type -COCH<sub>2</sub>-, -CO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO, n variant de 1 à 5, qui peut être substitué par un groupe alkyle ou amino.

60 Le couplage de ces dérivés bis-indoliques a été entrepris non seulement dans le but de mettre au point de nouveaux réactifs immunologiques mais surtout en vue de la préparation de substances anti-tumorales plus actives, plus sélectives et moins toxiques.

Dans cette dernière optique de nombreux conjugués protéiques avec d'autres agents antitumoraux sont actuellement étudiés. Il en est en particulier ainsi avec des conjugués d'anticorps et d'un fragment de la ricine ou de conjugués d'albumine et de méthotrexate (Demande de brevet français 2.437.213, C.M. Industries; B.C.F.Chu, S.B.Howell J. of Pharmacology and Exp. Therapeutics, 219 (2), 389-393, 1981).

Les anti-corps monoclonaux, en particulier ceux d'origine humaine, couplés aux médicaments anti-tumoraux connus sont plus particulièrement l'objet d'études diverses.

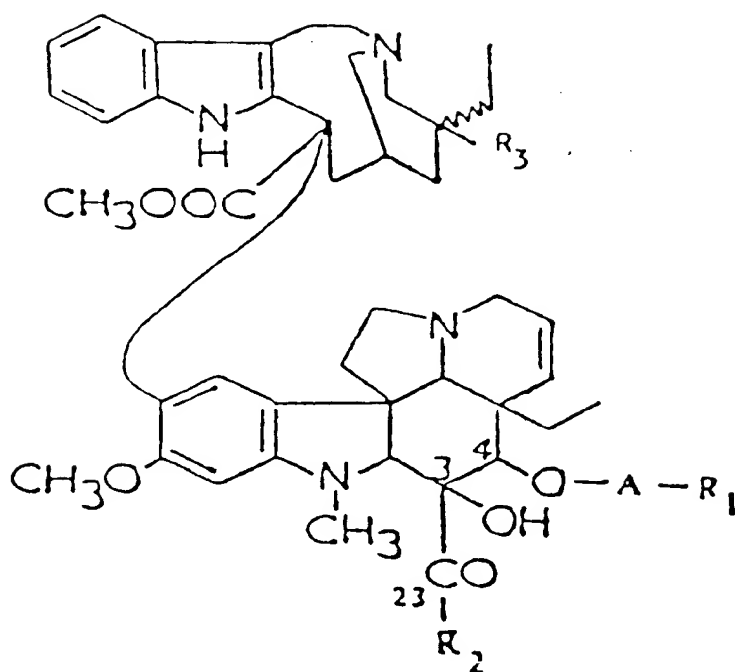
On relèvera enfin que l'utilisation et l'évaluation de complexes 1:1 d'alcaloïdes bis-indoliques avec la tubuline a été décrite dans le brevet belge 854 053. Dans certains cas il peut en résulter une toxicité moindre et une activité chimiothérapique plus importante que celles des alcaloïdes libres correspondants.

La présente invention concerne des produits nouveaux qui sont des conjugués de la vinblastine ou de dérivés de la vinblastine avec des protéines ou des fragments de protéines, caractérisés en ce que le couplage est effectué par l'intermédiaire d'un groupe ester dérivé du groupe hydroxyle du carbone 4 du squelette de la vinblastine.

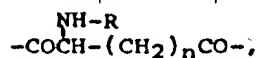
Ces conjugués suivant l'invention sont caractérisés en ce que la protéine, le fragment de protéine est couplé au composé de type vinblastine par l'intermédiaire d'un bras, par condensation préalable du dérivé de la vinblastine avec un dérivé organique bifonctionnel, éventuellement activé, selon une forme d'exécution préférée.

Le dérivé de la O-4-désacétylvinblastine peut être par exemple la vindésine, la O-4-désacétylvinblastine couplée en C-3 avec un acide aminé, la O-4-désacétyldésoxy-4'-vinblastine ou la O-4-désacétyldésoxy-4'-vinblastine couplée en C-3 avec un acide aminé.

Les composés de l'invention répondent plus particulièrement à la formule générale suivante



dans laquelle A représente un "bras" du type



n variant de 1 à 5 et R représentant un groupe acyle tel que acétyle, trifluoroacétyle ou carbobenzyloxy, R<sub>1</sub> représente un radical protéique éventuellement modifié, R<sub>2</sub> représente un groupe méthoxy, un groupe amino ou un radical ester d'acide alpha-aminé lié par une liaison de type amide et dont le groupe ester comporte de 1 à 6 atomes de carbone, R<sub>3</sub> représente un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyle, chaque fois dans les deux configurations possibles ainsi que leurs sels d'addition avec un acide minéral ou organique.

L'activité thérapeutique des composés de l'invention est supérieure à celle des composés décrits jusqu'à présent et sa toxicité est sensiblement inférieure.

Les dérivés de la présente invention sont obtenus, dans une première étape, par condensation d'un anhydride, par exemple l'anhydride aspartique ou glutamique ou homologue supérieur, éventuellement substitués sur le groupement amine, sur l'hydroxyle en C-4 de la O-4-désacétylvinblastine ou de la O-4-désacétyldésoxyvinblastine ou l'un des dérivés du type O-4-désacétylvinblastine-carboxamide-3 ou O-4-désacétyldésoxyvinblastine-carboxamide-3.

Les dérivés hémiaspartate ou hémiglutamate ou homologues supérieurs ainsi obtenus sont alors condensés avec la protéine, le fragment de protéine dans un solvant dans lequel ces composés sont solubles. On peut à cette fin utiliser un mélange eau-dioxane à un pH adéquat maintenu par un tampon, par exemple un tampon phosphate. La condensation est confirmée par chromatographie ou électrophorèse. Dans ce dernier cas on peut utiliser de la vinblastine radio-active (par exemple tritiée) afin de faciliter la caractérisation. Du point de vue chimique la condensation avec les protéines peut s'expliquer par l'obtention de liens covalents résultant de la réaction des groupes amines de la lysine protéique avec le groupe ester activé dérivé de l'hémiaspartate ou hémiglutamate, éventuellement substituée.

L'albumine de sérum bovin par exemple comprend 56 résidus aminés de lysine. Le nombre de molécule de vinblastine par protéine variera en fonction des conditions opératoires mais sera généralement compris entre 1 et 34.

L'activation peut être effectuée de manière classique par traitement avec un chloroformiate d'alkyle, de préférence le chloroformiate d'éthyle ou d'isobutyle, en présence d'une base aminée telle la N-méthylpipéridine ou la N-méthylmorpholine.

La condensation peut être effectuée in situ sur le mélange réactionnel contenant l'anhydride activé. Dans la plupart des cas l'anhydride activé peut cependant aussi être isolé.

Le conjugué obtenu est isolé au moyen de méthodes classiques utilisées en chimie ou, dans le cas de

l'application, par caractérisation certaines protéines, le conjugué est purifié.

Les protéines qui peuvent être avantageusement utilisées sont en particulier l'albumine de sérum bovin ou

humain, la fétuine ou des immunoglobulines, ces dernières étant éventuellement obtenues par la technique des anti-corps monoclonaux. Dans ce dernier cas, l'utilisation d'anti-corps monoclonaux d'origine humaine et montrant une certaine spécificité vis à vis de tumeurs humaines s'avère particulièrement intéressante.

Les protéines utilisées peuvent également être traitées afin d'être sélectivement modifiées. Ces modifications permettent d'obtenir des conjugués protéiques qui seront, lors de leur utilisation thérapeutique, préférentiellement concentrés au niveau de certains tissus, par exemple au niveau du foie. Il est ainsi possible, préalablement à la condensation du dérivé de la vinblastine à la protéine, de galactosyler cette dernière. La galactosylation est effectuée en appliquant par exemple le mode opératoire décrit par G Wilson dans *The Journal of Biochemistry*, 253 (7) 2070-2072, 1978.

Les essais in-vitro effectués avec les composés de l'invention pour démontrer leur activité anti-tumorale indiquent que la formation du conjugué par un lien en C-4 peut être plus avantageuse que lorsque ce lien est effectué en C-3.

En variante, on peut également condenser un composé du type -A-R<sub>1</sub>, A et R<sub>1</sub> ayant les significations susmentionnées, dans un solvant adéquat sur l'hydroxyle en C-4 de la O-4-désacétylvinblastine ou de la O-4-désacétyldésoxyvinblastine ou de l'un des dérivés du type O-4-désacétylvinblastine-carboxamide-3 ou O-4-désacétyldésoxyvinblastine-carboxamide-3. L'activation s'effectue avantageusement par traitement avec un chloroformate d'alkyle tel que le chloroformate d'éthyle ou d'isobutyle, en présence d'une base aminée telle que la N-méthylpipéridine ou la N-méthyl-morpholine ou la triéthylamine. Les exemples suivants décrivent quelques conjugués selon la présente invention dans lesquels les dérivés bisindoliques sont couplés, en position C-4 à une protéine, ou un fragment de protéine, moyennant un bras du type hemiaspartate substitué ou hémiglutamate substitué.

La présente invention s'étend également aux applications industrielles et notamment pharmaceutiques des composés bisindoliques nouveaux.

Les composés de l'invention présentent en effet des propriétés antitumorales particulièrement intéressantes et susceptibles d'être utilisées en thérapeutique humaine.

Ces dérivés de la vinblastine peuvent être, en particulier, utilisés pour le traitement des leucémies, de gliomes, de lymphosarcomes ou d'autres tumeurs malignes, y compris les tumeurs dites "solides".

En thérapeutique humaine, ils sont ainsi utilisés pour le traitement de la maladie de Hodgkin et pour d'autres tumeurs pouvant bénéficier d'un traitement avec la vinblastine, la vincristine ou la vindésine.

Pour leur application thérapeutique, les composés de l'invention, éventuellement sous forme lyophilisée, sont de préférence administrés par voie parentérale, dissous dans un solvant pharmaceutiquement acceptable.

L'eau physiologique ou d'autres solutions salines tamponnées, par exemple avec un phosphate, sont des solvants appropriés.

La substance active est généralement administrée à une posologie pouvant varier de 50 mg à plusieurs grammes. Les composés de l'invention peuvent en outre être utilisés en combinaison avec d'autres agents anti-tumoraux.

#### Exemple 1.

a) Isomères  $\alpha$  et  $\beta$  de la VBL-4-O-désacétyl-4-O-L-N-acétylhémiaspartate.

A une solution de 700 mg (0,91 mmol) de O-4-désacétylvinblastine dans 20 ml de dichlorométhane anhydre, on ajoute 250 mg d'anhydride N-acétyl-L-aspartique.

La solution est agitée 20 heures à température ambiante. Après distillation du solvant sous vide, le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (élution éther/méthanol/NH<sub>4</sub>OH 25%/60/49,75/0,25).

Après trituration dans un mélange de dichlorométhane et d'éther de pétrole, on obtient 650 mg du produit du titre sous forme d'une poudre blanche (rdt : 77%).

L'analyse du produit par HPLC indique la présence des deux isomères  $\alpha$  et  $\beta$  dans un rapport 85/15.

\* Spectre IR : (KBr) : 3420, 2960, 2880, 1737, 1660, 1613, 1501, 1460, 1430 cm<sup>-1</sup>.

\* Spectre de masse : DCI (isobutane) : 925 (M<sup>+</sup>), 939 (M<sup>+</sup> + 14), 857, 769, 693, 635.

b) Isomères  $\alpha$  et  $\beta$  de l'ester méthylrique de la VBL-4-O-L-N-acétyl-hémiaspartate.

Une solution de 500 mg (0,540 mmoles) des isomères  $\alpha$  et  $\beta$  de la VBL-4-N-acétyl-L-hémiaspartate dans 10 ml de méthanol absolu saturé avec de l'HCl sec est agitée 20 heures à température ambiante.

Après distillation du solvant sous vide, le résidu est repris par un mélange de 50 ml d'eau distillée et de 15 ml de dichlorométhane. Le mélange est alcalinisé par addition de NH<sub>4</sub>OH. La phase aqueuse est extraite avec 3 portions de 20 ml de dichlorométhane. Les extraits organiques sont combinés, lavés successivement par 40 ml d'eau et par 40 ml d'une solution aqueuse saturée en NaCl, séchés sur du sulfate de magnésium et évaporés sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur silice (élution par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 95/5). On obtient de cette façon 410 mg des isomères  $\alpha$  et  $\beta$  du produit du titre.

Rdt : 81%

Des fractions de chromatographie contenant chacune des isomères séparément ont été analysées.

## - Isomère principal

- \* Spectre de masse (DCI, isobutane) : 939 ( $M^+$ ), 940 ( $M^+ + 1$ ), 953 ( $M^+ + 14$ )
- \* Spectre IR (KBr) : 2950, 2880, 1740, 1675, 1615, 1503  $\text{cm}^{-1}$
- \* Spectre RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 360 MHz)  $\delta$  : 9,65 (OH), 8,02 (NH), 7,52 (H-9'), 7,16-7,05 (H-10', H-11', H-12'), 6,61 (H-9), 6,52 (NH), 6,07 (H-12), 5,75 (H-14), 5,52 (H-17), 5,17 (H-15), 4,75 (-CH-NH), 3,95 (H-17A'), 3,80 (-OMe), 3,77 (-OMe), 3,70 (-OMe), 3,60 (-OMe), 2,80 (H-21A', H-21B'), 2,67 (NMe), 2,62 (H-21), 2,00 (MeCO), 0,92-0,75 (2 Me)
- \* Rf : 0,51 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$  90:10 silice)

5

## - Isomère mineur

- \* Spectre MS (DCI - isobutane) : 939 ( $M^+$ ), 940 ( $M^+ + 1$ )
- \* Spectre IR (KBr) : 1740, 1675, 1615,  $\text{cm}^{-1}$
- \* Spectre RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 360 MHz)  $\delta$  : 9,25 (OH), 8,02 (NH), 7,50 (H-9'), 7,16-7,05 (H-10', H-11', H-12'), 6,57 (H-9), 6,52 (NH), 6,08 (H-12), 5,82 (H-14), 5,47 (H-17), 5,28 (H-15), 4,75 (CH-NHAc), 3,93 (H-17A'), 3,77 (2 x OMe), 3,70 (OMe), 3,60 (OMe), 2,70 (N-Me), 2,02 (MeCO-), 0,95-0,77 (2 Me)
- \* Rf : 0,39 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$  90:10 silice)

10

15

## Exemple 2.

Isomères  $\alpha$  et  $\beta$  de la VBL-4-O-désacétyl-4-O-L-N-carboxybenzyloxyhémiglutamate.

20

Une solution dans le dichlorométhane (5 ml) de 0-4 deacétylvinblastine (300 mg, 0,39 mmole), d'anhydride N-carbobenzyloxy-L-glutamique (144 mg, 0,519 mmole) est agitée 20 heures à température ambiante. Le solvant est évaporé sous vide.

Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (élution ether/methanol/ $\text{NH}_4\text{OH}$  25%/50/49,5/0,5).

25

On obtient de cette façon 230 mg du produit du titre sous forme d'un mélange d'isomères  $\alpha$  et  $\gamma$ .

L'analyse du produit par HPLC indique la présence des isomères  $\alpha$  et  $\gamma$  dans un rapport 60:40.

- \* Spectre IR (KBr) : 3450, 2960, 2880, 1730, 1612, 1593, 1501, 1459, 1432, 1228  $\text{cm}^{-1}$ .
- \* Spectre de masse (DCI - isobutane) : 1032 ( $M^+ + 1$ ), 984, 928, 723  $\text{cm}^{-1}$

30

## Exemple 3 : Couplage de la VBL-4-O-désacétyl-4-O-L-N-acétyl hémiaspartate à l'albumine humaine galactosylée.

a) 80,6 mg de VBL-4-O-désacétyl-4-O-L-N-acétylhémiaspartate sont dissous dans 2 ml de dioxanne. La solution est ensuite plongée dans un bain de glace. On y ajoute 24,4  $\mu\text{l}$  de triéthylamine dans 0,5 ml de dioxanne et 22,6  $\mu\text{l}$  de chloroformate d'isobutyle dans 0,5 ml de dioxanne. On agite pendant une heure. D'autre part, on prépare une solution de 200 mg d'albumine humaine galactosylée dans 37 ml d'eau. Le pH est ajusté à 8,5 avec de la soude 1N.

35

La solution est refroidie à 4°C. Après 1 heure, l'ester activé est ajouté à la solution d'albumine humaine galactosylée. La solution est agitée pendant 14 heures à 4°C tandis que le pH est maintenu à 8,5 par addition de soude 1N. La solution est purifiée par filtration sur gel Sephadex G25 équilibré par une solution de NaCl 9/1000, pH 7,5. Les fractions contenant le conjugué sont rassemblées, concentrées par ultrafiltration et stérilisées. Le contenu en protéines est mesuré par la méthode de Lowry et le contenu en alcaloïdes estimé par mesure de la radioactivité.

40

Le conjugué obtenu contient 13 moles de vinblastine par mole d'albumine humaine galactosylée. La détermination de la composition du conjugué en monomères, dimères et polymères, faite par HPLC, indique un pourcentage de 82 en monomères et 18 en dimères.

45

b) 80,6 mg de VBL-4-O-désacétyl-4-O-L-N-acétylhémiaspartate sont dissous dans 2 ml de dioxanne. La solution est ensuite plongée dans un bain de glace. On y ajoute 24,4  $\mu\text{l}$  de triéthylamine dans 0,5 ml de dioxanne et 22,6  $\mu\text{l}$  de chloroformate d'isobutyle dans 0,5 ml de dioxanne. D'autre part, on prépare une solution de 200 mg d'albumine humaine galactosylée dans 37 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 8,2. Le pH est ajusté à 8,5 avec de la soude 1N.

50

La solution est refroidie à 4°C. Après 1 heure, l'ester activé est ajouté à la solution d'albumine humaine galactosylée. La solution est agitée pendant 14 heures à 4°C tandis que le pH est maintenu à 8,5 par addition de soude 1N. La solution est purifiée par filtration sur gel Sephadex G25 équilibré par une solution de NaCl 9/1000, pH 7,5. Les fractions contenant le conjugué sont rassemblées, concentrées par ultrafiltration et stérilisées. Le contenu en protéines est mesuré par la méthode de Lowry et le contenu en alcaloïdes estimé par mesure de la radioactivité.

55

Le conjugué obtenu contient 13 moles de vinblastine par mole d'albumine humaine galactosylée. La détermination de la composition du conjugué en monomères, dimères et polymères, faite par HPLC, indique un pourcentage de 91,5 en monomères, 7 en dimères et 1,5 en polymères.

60

Les échantillons sont précipités par addition d'un volume d'acide trichloroacétique (TCA 40%). Après incubation des échantillons à 4°C pendant une heure, ceux-ci sont centrifugés et la radioactivité du surnageant est

65

estimée par comptage d'une partie aliquote en scintillation liquide.

La radioactivité soluble est une mesure de la digestion du conjugué. L'expérience démontre que 75% du conjugué sont digérés après 24 heures. On n'observe plus d'évolution jusqu'à 48 heures.

L'activité chimiothérapeutique du conjugué obtenu selon l'exemple a été évaluée sur la leucémie P388 administrée par voie i.p. chez la souris BDF<sub>1</sub> femelle : 10<sup>6</sup> cellules tumorales sont inoculées par voie i.p. au jour 0. Le conjugué est administré par voie i.p. au jour 1. Les résultats démontrent que le conjugué présente une activité très significative sur ce modèle expérimental puisqu'il induit une augmentation du temps de survie supérieure à 650% lorsqu'il est administré à la dose de 60 mg/kg et le nombre de survivants au jour 60 est de 5/5.

#### Exemple 4

Isomères  $\alpha$  et  $\gamma$  de N-(4-O-déacétyl-4-O-L-N-acétylhémiaspartatevinblastinoyl-23)-L-tryptophanate d'éthyle.

En suivant la procédure de l'exemple 1, on a transformé le N-(déacétyl-O-4-vinblastinoyl-23)-L-tryptophanate d'éthyle en N-(4-O-déacétyl-4-O-L-N-acétyl-hémiaspartate-vinblastinoyl-23)-tryptophanate d'éthyle (mélange des isomères  $\alpha$  et  $\gamma$ ).

Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur silice (élution = éther/méthanol/NH<sub>4</sub>OH à 25% = 50/49,75/0,25). On a obtenu 200 mg de produit à partir de 314 mg du produit de départ.

Spectre de masse : (DCI, Acétone) : 1126 (M<sup>+</sup>), 1066, 984, 970, 951, 911.

Spectre infrarouge (KBr) : 3400, 2960, 2940, 1740, 1665, 1618 cm<sup>-1</sup>.

#### Exemple 5

Isomères  $\alpha$  et  $\beta$  de N-(4-O-déacétyl-4-O-L-N-acétyl-hémiaspartatevinblastinoyl-23)-L-isoleucinate d'éthyle.

Conformément à la procédure de l'exemple 4, on a transformé du N-(déacétyl-O-4-vinblastinoyl-23)-L-isoleucinate d'éthyle en N-(4-O-déacétyl-4-O-L-N-acétyl-hémiaspartate-vinblastinoyl-23)-L-isoleucinate d'éthyle.

Spectre de masse : (DCI-acétone) : 1051 (M<sup>+</sup>), 1036, 1009, 977, 897, 838, 755, 709, 652.

Spectre infrarouge (KBr) : 3410, 2963, 2929, 2880, 1734, 1676, 1612, 1500, 1460, 1430, 1372, 1333, 1293 cm<sup>-1</sup>.

#### Exemple 6

Isomères  $\alpha$  et  $\gamma$  de 4-O-déacétyl-4-O-L-N-acétylhémiglutamate vinblastine.

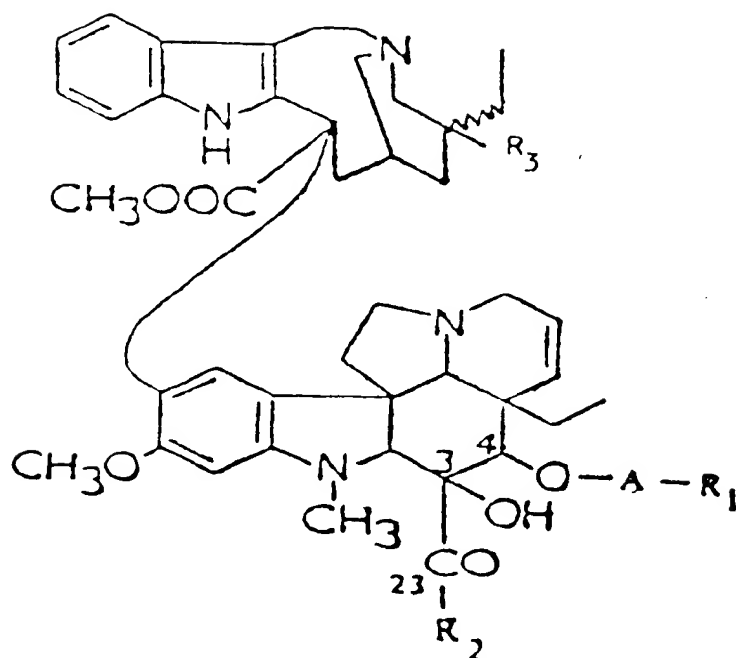
Conformément à la procédure de l'exemple 2, on a traité le O-4-déacétylvinblastine avec de l'anhydride N-acétyl-L-glutamique en vue de produire 271 mg de O-4-déacétyl-4-O-L-N-acétyl-hémiglutamate vinblastine (mélange des isomères  $\alpha$  et  $\gamma$ ) à partir de 380 mg de O-4-déacétylvinblastine.

Spectre de masse (DCI-acétone) : 940 (M<sup>+</sup>), 871, 707.

Spectre infrarouge (KBr) : 3470, 2960, 2880, 1740, 1665, 1617 cm<sup>-1</sup>.

#### Revendications

1. Conjugué de vinblastine ou d'un dérivé de celle-ci répondant à la formule générale



dans laquelle A représente un "bras" du type

$\text{NH}-\text{R}$   
 $-\text{COCH}-(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$ , n variant de 1 à 5 et R représentant un groupe acyle tel que acétyle, trifluoroacétyle ou carbobenzyloxy,  $\text{R}_1$  représente un radical protéique éventuellement modifié,  $\text{R}_2$  représente un groupe méthoxy, un groupe amino ou un radical ester d'acide alpha-aminé lié par une liaison de type amide et dont le groupe ester comporte de 1 à 6 atomes de carbone,  $\text{R}_3$  représente un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyle, chaque fois dans les deux configurations possibles.

2. Conjugué selon la revendication 1 caractérisé en ce que le radical protéique est dérivé de l'albumine de sérum bovin ou humain, la fétuine ou des immunoglobulines éventuellement obtenues par la technique des anticorps monoclonaux, de préférence d'anticorps monoclonaux humains.

3. Conjugué selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que l'ester d'acide aminé est le tryptophanate d'éthyle ou l'isoleucinate d'éthyle.

4. Conjugué selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que  $\text{R}_2$  représente un groupe méthoxy ou amino.

5. Procédé de préparation de conjugués selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'on condense un anhydride d'acide du type

$\text{NH}-\text{R}$   
 $\text{HOOC}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ , sur l'hydroxyle en position C-4 du dérivé de la vinblastine, et en ce qu'on condense ensuite le dérivé obtenu avec le radical protéique.

6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que le solvant de la première condensation consiste essentiellement en du dichlorométhane et en ce que le solvant utilisé dans la deuxième étape de condensation est un mélange d'eau et de dioxanne.

7. Procédé de préparation de conjugués selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'on condense un composé du type

$\text{NH}-\text{R}$   
 $-\text{CO}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_n-\text{COR}_1$ ,  $\text{R}_1$  étant un radical protéique, sur l'hydroxyle en position C-4 du dérivé de la vinblastine.

8. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'on effectue une activation du composé de départ, par traitement avec un chloroformiate d'alkyle tel que le chloroformiate d'éthyle ou d'isobutyle, en présence d'une base aminée telle que la N-méthyl-pipéridine ou la N-méthyl-morpholine ou la triéthylamine.

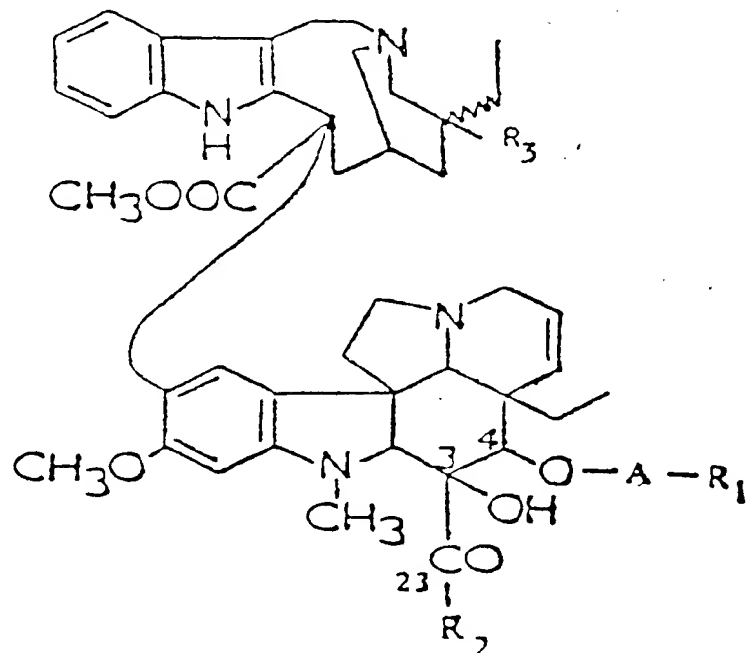
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 8 caractérisé en ce qu'on effectue encore une centrifugation, un rinçage, une lyophilisation et/ou une purification par filtration sur gel, ainsi qu'essentiellement une succinylation classique.

10. Procédé de préparation de conjugués selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que le radical protéique est dérivé de l'albumine de sérum bovin ou humain, la fétuine ou des immunoglobulines éventuellement obtenues par la technique des anticorps monoclonaux, de préférence d'anticorps monoclonaux humains, le radical protéique étant éventuellement traité afin d'être sélectivement modifié.

11. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comporte les conjugués selon l'une des revendications 1 à 4, en combinaison avec un diluant, solvant, excipient ou support pharmaceutiquement acceptable, le composé actif se trouvant sous forme lyophilisée ou en solution dans un solvant tamponné, pour le traitement des leucémies, de lymphosarcomes ou autres tumeurs malignes, y compris les tumeurs dites "solides" et pour le traitement de la maladie d'Hodgkin.

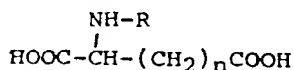
Revendications pour l'Etat contractant suivant AT

1. Procédé pour la préparation de conjugués de vinblastine ou d'un dérivé de celle-ci répondant à la formule générale



dans laquelle A représente un "bras" du type

$\text{NH}-\text{R}$   
 $-\text{CO}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$ , n variant de 1 à 5 et R représentant un groupe acyle tel que acétyle, trifluoroacétyle ou carbobenzyloxy, R<sub>1</sub> représente un radical protéique éventuellement modifié, R<sub>2</sub> représente un groupe méthoxy, un groupe amino ou un radical ester d'acide alpha-aminé lié par une liaison de type amide et dont le groupe ester comporte de 1 à 6 atomes de carbone, R<sub>3</sub> représente un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyle, chaque fois dans les deux configurations possibles caractérisé en ce qu'on condense un anhydride d'acide du type



sur l'hydroxyle en C-4 du dérivé de vinblastine et en ce qu'on condense ensuite le dérivé ainsi obtenu avec ledit radical protéique; ou bien en ce qu'on condense un composé du type

$\begin{array}{c} \text{NH}-\text{R} \\ | \\ -\text{CO}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_n-\text{COR}_1 \end{array}$ , R<sub>1</sub> étant un radical protéique, sur l'hydroxyle en position C-4 du dérivé de la vinblastine.

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le radical protéique est dérivé de l'albumine de sérum bovin ou humain, de la fétuine ou des immunoglobulines éventuellement obtenues par la technique des anticorps monoclonaux, de préférence les anticorps monoclonaux humains.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que, lors de la condensation d'un anhydride d'acide du type

$\begin{array}{c} \text{NH}-\text{R} \\ | \\ \text{HOOC}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH} \end{array}$  sur l'hydroxyle en C-4 du dérivé de la vinblastine, on utilise un solvant qui consiste essentiellement en du dichlorométhane et en ce que, lors de la condensation du produit ainsi obtenu avec le radical protéique, on utilise un solvant qui consiste essentiellement en un mélange d'eau et de dioxane.

4. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que, lors de la condensation du produit du type  $-\text{A}-\text{R}_1$  avec le dérivé de vinblastine en position C-4, on active celui-ci par traitement avec un chloroformate d'alkyle tel que le chloroformate d'éthyle ou d'isobutyle, en présence d'une base aminée telle que la N-méthyl-pipéridine ou la N-méthyl-morpholine ou la triéthylamine.



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

Numéro de publication:

**0 222 722  
A3**

(3)

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(4) Numéro de dépôt: **86870042.8**

(5) Int. Cl.<sup>4</sup> **C07K 15/00 , A61K 37/02 ,  
A61K 39/395 , A61K 47/00 ,  
A61K 31/475 , //C07D519/04**

(12) Date de dépôt: **08.04.86**

(10) Priorité: **12.11.85 LU 86157**

(13) Date de publication de la demande:  
**20.05.87 Bulletin 87/21**

(34) Etats contractants désignés:  
**AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE**

(18) Date de publication différée du rapport de  
recherche: **06.09.89 Bulletin 89/36**

(71) Demandeur: **OMNICHEM Société anonyme**  
**12 Avenue de Broqueville**  
**B-1150 Bruxelles(BE)**

(72) Inventeur: **Trouet, André Benoît Léon**  
**29 Predikherenberg**

**B-3009 Winksele(BE)**

Inventeur: **Rao, Kandukuri Sivaprasade**  
**Bushana**

**11 rue Kwakembienne**

**B-1331 Rosieres(BE)**

Inventeur: **Hannart, Jean-Alfred Alphonse**  
**25 Avenue d'El Pirere**

**B-1302 Dion-Valmont(BE)**

Inventeur: **DeJonghe, Jean-Paul**

**94 Rue Ch.Jaumotte**

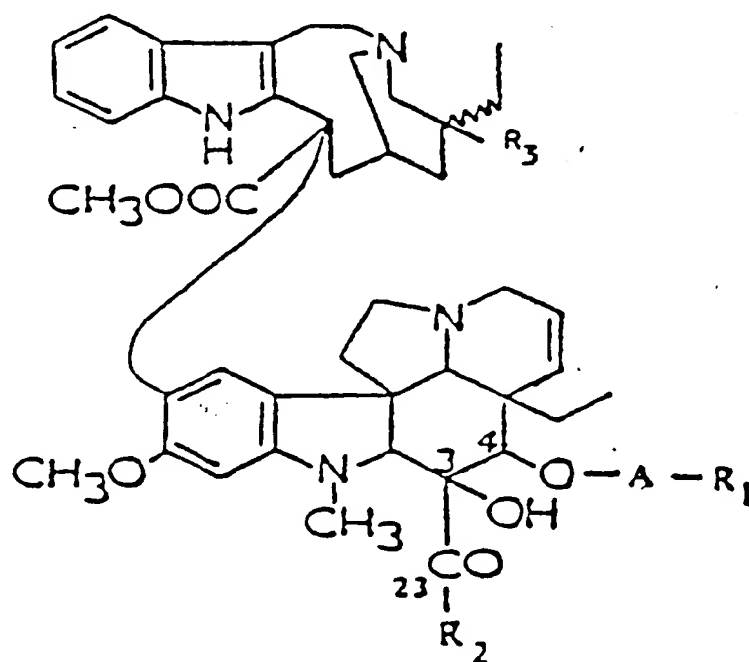
**B-1350 Wavre(BE)**

(74) Mandataire: **Van Malderen, Michel et al**  
**p.a. Freylinger & Associés 22 avenue J.S.**  
**Bach (bte 43)**  
**B-1080 Bruxelles(BE)**

(54) **Nouveaux conjugués de la vinblastine et de ses dérivés, procédé pour leur préparation et compositions pharmaceutiques contenant ces conjugués.**

(57) On décrit des nouveaux conjugués de vinblastine ou de dérivés de celle-ci répondant à la formule générale

EP 0 222 722 A3



dans laquelle A représente un "bras" du type

$$\begin{array}{c} \text{NH} - \text{R} \\ | \\ -\text{CO} - \text{CH} - (\text{CH}_2)_n - \text{CO}- \end{array}$$
 n variant de 1 à 5 et R représentant un groupe acyle tel que acétyl, trifluoroacétyl ou carbobenzyloxy, R<sub>1</sub> représente un radical protéique éventuellement modifié, R<sub>2</sub> représente un groupe méthoxy, un groupe amino ou un radical ester d'acide alpha-aminé lié par une liaison de type amide et dont le groupe ester comporte de 1 à 6 atomes de carbone, R<sub>3</sub> représente un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyle, chaque fois dans les deux configurations possibles.



Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 86 87 0042

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
Y	EP-A-0 153 151 (ELI LILLY & CO.) * Revendications; page 9, lignes 17-27; page 10, lignes 9-26 *	1-2,4-5 ,10-11	C 07 K 15/00 A 61 K 37/02 A 61 K 39/395
Y	EP-A-0 121 388 (LILLY INDUSTRIES LTD) * Revendications; page 4, lignes 16-18; page 9, lignes 1-5 *	1-2,4-5 ,10-11	A 61 K 47/00 A 61 K 31/475// C 07 D 519/04
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
			A 61 K C 07 D
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 05-06-1989	Examineur SCARPONI U.

(3402)

EPO 10

Le présent document est un document de l'Office européen des brevets.  
O : divulgation non-écrite  
P : document intercalaire

& le nombre de la même famille, document correspondant

